



AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA E DO VÍRUS DENV ATRAVÉS DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Beatriz Dantas Guimarães (1); Lucas Linhares de Locio (2); Herbert Crisóstomo dos Santos Araújo (3); Mathias Weller (4)

¹ Departamento de Farmácia - Universidade Estadual da Paraíba; biadantasg@gmail.com

² Departamento de Farmácia - Universidade Estadual da Paraíba; lucas.locio@gmail.com

³ Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual da Paraíba; hortgabi@hotmail.com

⁴ Departamento de Ciências Biológicas - Universidade Estadual da Paraíba; mathiasweller@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A tecnologia de reação em cadeia da polimerase foi concebida na década de 1980, tendo como sua maior aplicação a possibilidade de amplificar determinado segmento de DNA através de síntese enzimática *in vitro*, produzindo milhões de cópias do segmento específico selecionado (CARUSO, 2007; ZAHA et al., 1996). A PCR envolve três etapas, que constituem um ciclo básico de replicação por PCR: desnaturação do DNA-molde, hibridização com “primers” que delimitarão a região de interesse a ser duplicada, extensão do segmento selecionado utilizando a enzima DNA-polimerase. Várias outras aplicações podem ser atribuídas e auxiliadas por essa técnica: a amplificação de um gene utilizando a PCR é uma etapa primordial para obter a quantidade de DNA necessária para ser aplicada na etapa de clonagem molecular, e a PCR em tempo real é hoje aplicada para quantificar a expressão de genes (CARUSO, 2007).

A clonagem gênica tem objetivo de introduzir um gene selecionado dentro de bactérias idênticas entre si (NASCIMENTO et al., 1999) e consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas, sendo a técnica central para estabelecer o método da tecnologia do DNA recombinante (CARUSO, 2007). O gene amplificado deve ser ligado ao vetor e a molécula híbrida deve ser introduzida numa célula hospedeira, geralmente células bacterianas (LIMA, 2008). A manipulação de genes específicos utilizando transformação bacteriana contendo as moléculas de DNA transgene permite, ao fim das etapas, a expressão e obtenção de proteínas híbridas.

A dengue é uma doença infecciosa aguda que constitui um dos grandes problemas de saúde pública no mundo e seu agente etiológico, o vírus da dengue (DENV), compreendem quatro sorotipos virais de importância epidemiológica (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). O genoma do DENV



codifica uma única poliproteína, posteriormente clivada em sete proteínas não- estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) e três proteínas estruturais que constituem o vírus (proteína C do capsídeo, proteína M da membrana e proteína E do envelope) (CHAMBERS et al., 1990).

O gene E, alvo principal deste trabalho, é o mais utilizado para estudos moleculares do DENV, devido à importância da glicoproteína E codificada por este gene (CHAMBERS et al., 1990; LEITMEYER et al., 1999). A proteína E é a maior proteína da superfície da partícula viral, com importantes funções na atividade biológica viral. Estudos sugerem que a proteína E é a mais indicada para escolha no diagnóstico do sorotipo viral (BARROS, 2007) por estar exposta na superfície do vírion, ser responsável pela interação com receptores celulares e representar o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (JAISWAL et al., 2003), enfatizando a importância da presente pesquisa, que teve como objetivo de estabelecer técnicas para amplificação do gene E do DENV-2 e DENV-4: sendo estas etapas essenciais à clonagem e expressão da proteína E destes sorotipos.

METODOLOGIA

Para o processo de clonagem, é necessário realizar a amplificação por PCR do gene E de DENV-2 e DENV-4, para que se possa prosseguir com as etapas subsequentes. A molécula de DNA utilizada neste trabalho foi obtida da FIOCRUZ em Recife, contendo o gene da proteína E do DENV-2 e DENV-4, com cerca de 1500 pares de base.

Primers e mistura de reação

Os *primers* forward (F) e reverse (R) para DENV-2 e DENV-4 foram utilizados nas combinações abaixo:

DENV-2:

DE2-F3R2

DE2-F4R3

DENV-4:

DE4-F2R2

DE4-F3R3

É importante ressaltar que a combinação de *primers* DE2-F4R3 e DE4-F3R3 inicia a síntese no gene prM (gene da glicoproteína precursora da membrana), externamente ao gene E (*primers* externos), comparado à combinação DE2-F3R2 e DE4-F2R2 (*primers* internos), que iniciam e



terminam a síntese diretamente no gene E.

Esta técnica é denominada *Nested PCR*. Haja vista que seriam utilizados fragmentos de DNA maiores - resultantes da PCR dos *primers* externos – como template, o gene E teria mais chances de sucesso na amplificação, aumentando a sensibilidade da técnica.

Todas as amplificações dos DNAs (DENV-2, DENV-4, pGEX-2T) com seus respectivos *primers* e componentes, nas devidas quantidades, ocorreram num mesmo ciclo de programação do termociclador:

Tabela 1 - Programação dos ciclos de temperatura em termociclador da PCR, para amplificação do gene E da dengue e do vetor de clonagem pGEX-2T.

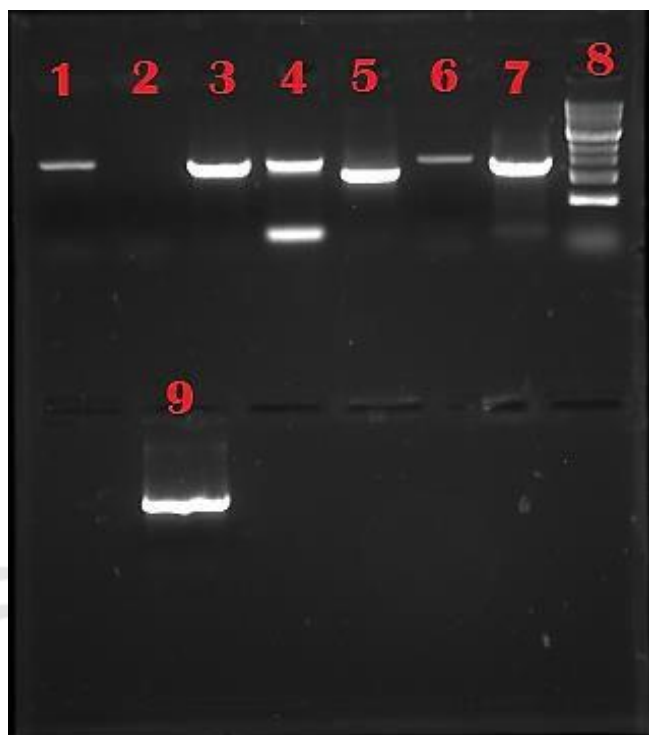
	Início	30 ciclos			Fim	
		<i>Desnaturação do DNA</i>	<i>Anelamento dos primers</i>	<i>Polimerização</i>		
Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
Tempo (segundos)	60s	30s	30s	90s	300s	∞

Eletroforese

Para a separação e visualização dos fragmentos amplificados pela técnica de PCR, realizou-se a eletroforese em gel de agarose, preparado na proporção a 1% (0,5g de agarose – 50 mL de tampão TAE 1x).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado das amplificações por PCR separadas em gel de agarose podem ser visualizadas na figura:



A tabela 2 abaixo descreve a mistura de componentes da PCR correspondente a cada número ilustrado na figura:

Tabela 2– Mistura de componentes da PCR correspondente a cada poço, como indicado na figura 11.

PCR	DNA	Primers	Tamanho esperado
1	DENV-2	DE2-F3R2 (internos)	1488 pb
2	DENV-2	DE2-F4R3 (externos)	1976 pb
3	DENV-4	DE4-F2R2 (internos)	1486 pb
4	DENV-4	DE4-F3R3 (externos)	1546 pb
5 e 9	pGEX-2T	pGEX-F2R2	1146 pb
6	PCR 2	DE2-F3R2 (internos)	1488 pb
7	PCR 4	DE4-F2R2 (internos)	1486 pb
8	Marcador	-	Fragmentos de tamanhos em pares de base e em ordem decrescente iguais a: 10.000 pb; 8.000 pb; 6.000 pb; 5.000 pb; 4.000 pb; 3.000 pb; 2.000 pb; 1.500 pb; 1.000 pb; 500 pb e 100 pb



O tamanho dos fragmentos que foram amplificados com sucesso, correspondem ao tamanho esperado de cada trecho.

Nos **PCR's 6 e 7**, em que foram utilizados os produtos de **PCR 2 e PCR 4**, respectivamente, como DNA template (Nested PCR) e os *primers* internos, houve produção de fragmentos de tamanhos correspondentes ao das ampliações dos **PCR's 1 e 3** (DENV-2 e DENV-4 como template, e *primers* internos) nesta ordem, como também era esperado.

No **PCR 4** com a combinação da molécula de DNA de DENV-4 e *primers* externos, observam-se duas bandas, quando o previsto seria o aparecimento de apenas uma. Este resultado indica que pelo menos um dos *primers* fez um anelamento em local errôneo.

É possível observar que no **PCR 2** (Template: DENV-2, *primers* externos) não houve amplificação. Já nos **PCR 1** (Template: DENV-2, *primers* internos) e **PCR 6** (Template: PCR 2, *primers* internos) obtiveram amplificação de tamanho esperado, embora tenham sido mais fracamente amplificados em comparação aos demais.

Apesar dos resultados obtidos para molécula de DNA do sorotipo-2, é possível utilizar o produto da amplificação com os *primers* internos na etapa de inserção do gene E no vetor de clonagem.

CONCLUSÕES

Este trabalho estabeleceu técnicas para amplificação do gene E dos sorotipos virais 2 e 4 da dengue. Uma vez determinadas, as técnicas da amplificação do gene E são imprescindíveis nas etapas de obtenção de DNA recombinante no processo de clonagem e expressão da proteína E da dengue.

Outras técnicas precisam ser realizadas até expressão da proteína E, incluindo as etapas ligação do gene E amplificado ao plasmídeo, a transformação de bactérias com o vetor plasmídeo contendo o DNA recombinante, e a expressão e purificação da proteína E quimérica resultante do transgene, com controle da expressão em Western Blot.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, Maria Creuza do Espírito Santo. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.



CARUSO, Celia Sulzbacher. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes de Xylella fastidiosa**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHAMBERS, Thomas J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990.

JAISSWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN S. Replication-defective adenoviral vaccine vector for the induction of immune responses to Dengue virus type 2. **Journal Of Virology** v. 77 (23), p. 12907-12913, 2003.

LIMA, L.M. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 2008.

LEITMEYER, Katrin C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

NASCIMENTO, Alexandra AC et al. **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, p. 85, 1999.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane MP. **Biologia Molecular Básica-5**. Artmed Editora, 2014.